DOI:10.11931/guihaia.gxzw202212045

刺五加新品种‘紫加 1 号’多糖分离纯化及抗氧化活性分析

周锦燕，张芸，刘良燕，张慧，阮流洋，曾千春*

（云南农业大学 农学与生物技术学院，昆明 650201）

摘 要： ‘紫加 1 号’为本课题组选育的刺五加(*Acanthopanax senticosus*)新品种，嫩茎叶灰紫色且味甘。本研究旨在分离纯化‘紫加 1 号’嫩茎叶多糖，测定各组分的单糖组成和分子量大小、评价各组分的抗氧化活性。以‘紫加 1 号’嫩茎叶为原料，采用水提醇沉工艺，经大孔树脂吸附法除杂脱色得到粗多糖（*A.* polysaccharides，ASPS）；通过 DEAE-Cellulose 52 离子柱和 Sephadex G-100 凝胶柱分离纯化得多糖组分；采用离子色谱和凝胶色谱-示差-多角度激光光散射色谱测定各均一组分的单糖组成和分子量；通过测定均一组分清除羟基自由基(·OH)、超氧阴离子自由基(O_2^-·)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼自由基(DPPH)的能力，分析其体外抗氧化活性强弱。结果表明：ASPS 经分离纯化得到 4 种多糖组分，酸性多糖 ASPA-1-1、ASPA-2-1 、ASPA-3-1 和中性多糖 ASPN-1，其分子量依次为 8.10、26.15、0.91 和 0.89 kDa，主要由阿拉伯糖、鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、核糖、半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸等按照不同比例组成的杂多糖。ASPA-1-1、ASPA-2-1、ASPA-3-1 和 ASPN-1 均具有明显的抗氧化活性，其中 ASPA-2-1 清除·OH 和 DPPH 的能力高于 ASPA-1-1、ASPA-3-1 和 ASPN-1；ASPA-3-1 清除 O_2^-·的能力最强。因此，从‘紫加 1 号’中分离纯化得到的多糖具有较好的抗氧化活性，为其进一步深度研究与开发利用提供一定科学理论依据。

关键词： 紫加 1 号，嫩茎叶，多糖，分离纯化，单糖组成，分子量，抗氧化活性

中图分类号： Q943　　　**文献标识码：** A　　　**论文编号：**

Isolation and purification the polysaccharides and its antioxidant activity of ‘Zijia 1’ novel variety of *Acanthopanax senticosus*

ZHOU Jinyan, ZHANG Yun, LIU Liangyan, ZHANG Hui, RUAN Liuyang, ZENG Qianchun*

(*College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University*, Kunming 650201，China)

Abstract: ‘Zijia 1’ is a new variety of *Acanthopanax senticosus* bred by our team, its tender stems and leaves characterized with gray-purple color and sweet taste. This study is aim to isolate and purify the polysaccharides from the tender stems and leaves of ‘Zijia 1’, and determine the monosaccharide composition and molecular weight of different fractions obtained after separation, and the antioxidant activity of each fraction was evaluated. The crude *A.* polysaccharides (ASPS)

基金项目： 云南省院士专家工作站“宋宝安院士工作站”(2019IC007)。

作者简介： 周锦燕（1997-），女，河南汝州人，硕士研究生，主要研究方向为高等植物资源评价与利用。（E-mail）3025017465@qq.com。

***通信作者：** 曾千春（1964-），男，湖南祁阳人，博士，教授，主要从事作物种质创新与育种研究。（E-mail）zengqianchun@qq.com。

were obtained from the tender stems and leaves of ‘Zijia 1’ by water extraction and alcohol precipitation, which were then separated and purified by DEAE-Cellulose 52 ion column and Sephadex G-100 gel column to obtain a uniform component. The ion chromatography and gel permeation chromatography-refractive index-multi-angle laser light scattering method was exploited to determine the monosaccharide compositions and molecular weight of the polysaccharides fractions. The hydroxyl radical (·OH), superoxide radical ($O_2^{-}\cdot$) and 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) scavenging ability were determined to evaluate the antioxidant of each fraction *in vitro*. Four polysaccharides ASPA-1-1, ASPA-2-1, ASPA-3-1 and ASPN-1 were isolated and purified from ASPS, with molecular weight of 8.10, 26.15, 0.91and 0.89 kDa, respectively, mainly composed of arabinose, rhamnose, galactose, glucose, xylose, mannose, ribose, galacturonic acid and glucuronic acid in different proportions. The ASPA-1-1、ASPA-2-1、ASPA-3-1 and ASPN-1 from ‘Zijia 1’ demonstrated significant scavenging activities on ·OH, $O_2^{-}\cdot$ and DPPH free radical, the ability of ASPA-2-1 to scavenge ·OH and DPPH is higher than ASPA-1-1, ASPA-3-1 and ASPN-1; ASPA-3-1 has the strongest ability to scavenge $O_2^{-}\cdot$. Therefore, the purified polysaccharides from 'Zijia 1' has obvious antioxidant activity, which provides a scientific theoretical basis for its further utilization.

Key words: Zijia 1, tender stems and leaves, isolation and purification， polysaccharides, monosaccharide compositions, molecular weight, antioxidant activity

‘紫加 1 号’源于云南省哀牢山南麓墨江县境内的野生刺五加（*Acanthopanax senticosus*），多年生常绿植物，本课题组选育（云林园植新登第 20220011 号）。[1]其嫩茎叶呈灰紫色且味甘，有别于普通刺五加嫩茎叶绿色而味苦；富含蛋白质、粗纤维和维生素，是一种高钾、高钙、高镁、低钠的木本蔬菜（管颖等，2018），其根可入药，性温，具有益气健脾、补肾安神和扶正固本的作用（王正琴，2018），药用价值很高，在医疗和保健方面发展前景可观。

多糖是由多个单糖通过糖苷键连接而成的结构复杂、极性大的化合物（Ullah et al., 2019），天然多糖因具有良好的生物活性、无毒性、生物降解性和生物相容性等特点（周洋等，2021），成为目前国内外研究的热点。刺五加多糖已证实具有抗氧化（姬普雨等，2022）、抑制癌细胞增殖（彭莉等，2020）和治疗免疫性肝损伤等能力（Zhang et al.，2019）。目前大多数研究主要集中在刺五加根茎和叶上，但对于‘紫加 1 号’不同级分多糖的抗氧化性分析尚未见报道。从‘紫加 1 号’原料中提取的多糖含有大量的蛋白质、色素等杂质，分离纯化多糖是目前的研究重点。因此，对‘紫加 1 号’多糖的不同级分及抗氧化活性进行综合比较和评价具有一定的意义。

本研究以‘紫加 1 号’嫩茎叶多糖为研究对象，依托现代色谱分离技术、光谱学手段及药理学方法，拟解决以下问题：（1）‘紫加 1 号’嫩茎叶多糖的分子量；（2）‘紫加 1 号’嫩茎叶多糖的单糖组成；（3）‘紫加 1 号’嫩茎叶多糖的体外抗氧化活性，为‘紫加 1 号’作为天然抗氧化剂的进一步开发利用及精细深加工提供依据，

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

本课题组选育的刺五加新品种（云林园植新登第 20220011 号）‘紫加 1 号’嫩茎叶，即枝条顶端 7～5 cm 幼嫩部分为材料，取自云南省墨江县（101°41′ E 、23°25′ N ，海拔：1 282 m）。70 ℃烘干至恒重，揉碎，分装于自封袋中，样品于常温干燥环境下避光保存。AB-8 大孔吸附树脂（北京索莱宝科技有限公司）；玻璃层析柱（四川蜀玻（集团）有限责任公司）；

DEAE-Cellulose 52、Sephadex G-100、透析袋（上海源叶生物科技有限公司）；单糖标准品（HPLC ≥ 98%）、氢氧化钠（色谱纯）、醋酸钠（美国 Sigma 公司）；三氟乙酸（色谱纯）、硝酸钠、甲醇、氯化钠、苯酚、浓硫酸、邻苯三酚、盐酸、维生素 C（Vc）、水杨酸、Tris 和硫酸亚铁等均为国产分析纯。

1.2 试验仪器

DZF - 6050 真空干燥箱（上海-恒科学仪器有限公司）、ALPHA 1-2 LD plus 真空冷冻干燥机（德国 Marin Christ 公司）、UV-6100S 紫外可见光光度计（上海元析仪器有限公司）、XH-T 漩涡混合器（新宝仪器）、Reacti - thermo 氮气吹扫仪（Thermo）、ICS5000 离子色谱仪（Thermo）、OPTILAB T-rex 示差检测器（Wyatt）、DAWN HELEOS-Ⅱ激光光散射检测器（Wyatt）。

1.3 试验方法

1.3.1 多糖的提取

采用热水煮提法提取多糖（谭超杰等，2022），称取样品 300 g，加入 5.0 L 超纯水浸泡 2.0 h 后进行煮提，收集滤液并浓缩至原体积溶液的 1/5，3 500 r · min^{-1} 离心 5 min，取上清，经 AB-8 大孔吸附树脂柱（10 cm×30 cm）除杂脱色后，加入无水乙醇至浓度为 95%，4 ℃醇沉 12 h，取沉淀，-30 ℃真空冻干后得粗多糖 ASPS。

1.3.2 多糖的含量测定

采用苯酚-硫酸法测定‘紫加 1 号’多糖含量（于淼等，2019）。称取无水葡萄糖标准品 10 mg，溶于 100 mL 的超纯水中，依次吸取 (0、0.3、0.6、0.9、1.2、1.5、1.8) mL 标准溶液于试管中，超纯水定容至 2 mL，依次加入 6%苯酚 1 mL 和浓硫酸 5 mL，摇匀后放置 5 min，置沸水中反应 15 min，冷却至室温后，测定 490 nm 的吸光度。质量浓度（μg · mL^{-1}）为横坐标，吸光度为纵坐标绘制标准曲线，标准曲线回归方程为：y=0.0141x + 0.0056，R^2=0.9995，无水葡萄糖在 15 ~ 90 μg · mL^{-1} 线性关系良好。

称取 ASPS 10 mg，超纯水溶解并定容至 5 mL，取 2 mL 于试管中，加入与上述相同的试剂，490 nm 处测定吸光度，通过以下公式计算多糖的含量。

$$\text{含量（\%）} = \frac{m \times V_T \times N}{m_0 \times V_S \times 10^6} \times 100$$

式中：m 为从标准曲线查到的多糖量（μg）；V_T 为样品总体积（mL）；V_S 为测定的样品体积（mL）；N 为稀释倍数，本试验取 1；10^6 为 1g=10^6 μg；m_0 为样品质量（g）。

1.3.3 多糖的分离纯化

（1）多糖的离子交换柱线性梯度洗脱分析

称取 10 mg ASPS 溶解于 10 mL 超纯水中，4 ℃，3500 r · min^{-1} 离心 10 min 取上清，上样品至 DEAE-Cellulose 52 离子柱(2.5 cm×45 cm)，依次用超纯水和 0.1~1.0 mol · L^{-1} 的 NaCl 溶液进行洗脱，流速为 5 s · d^{-1}，每管收集洗脱液 5 mL，每管吸取 1 mL 采用苯酚-硫酸法在 490 nm 处测定吸光度，以管数为横坐标，吸光度为纵坐标作洗脱曲线。

（2）多糖离子交换柱层析制备

称取 10 g ASPS 溶于 200 mL 超纯水中，依次用 4.0 L 超纯水、0.3 mol · L^{-1}、0.6 mol · L^{-1} 和 0.8 mol · L^{-1} 的 NaCl 溶液洗脱，设定流速为 5 s · d^{-1}，收集洗脱液，减压浓缩后用截留分子量为 3.5×10^3 Da 的透析袋除去盐及色素，冻干备用。

（3）多糖的凝胶过滤层析制备

称取适量上述多糖样品溶于超纯水中，10000 rpm×5 min 条件下离心，取上清，上样品于 Sephadex G-100 凝胶柱（1.5 cm×100 cm），洗脱液为超纯水，流速为 10 s · d^{-1}，每管收集洗脱液 10 mL，每管吸取 1 mL 用苯酚-硫酸法在 490 nm 处测定吸光度，以管数为横坐标，吸光度为纵坐标作洗脱曲线，合并洗脱峰，浓缩冻干保存，即得纯化后的均一多糖。

1.3.4 分子量测定

采用凝胶色谱-示差-多角度激光光散射色谱系统对多糖分子量进行测定（胡卫珍等，2020）。称取适量多糖样品溶解于 0.1 mol·L^{-1} $NaNO_3$溶液中，浓度为 1.0 mg·mL^{-1}，完全溶解后通过 0.45 μm 的滤膜过滤，转移至进样瓶中进行检测，采用 Astra6 软件收集和处理数据。

示差检测器：Optilab T-rEX (Wyatt technology, CA, USA)，激光光散射检测器：DAWN HELEOS Ⅱ (Wyatt technology，CA，USA)；凝胶排阻色谱柱(OHpak SB-805 HQ (300 mm × 8 mm)，OHpak SB-804 HQ (300 mm × 8 mm)，OHpak SB-803 HQ (300 mm × 8 mm)；流动相：0.1mol·L^{-1} $NaNO_3$；进样量 100 μL，流速：0.4 mL·min^{-1}，洗脱梯度：等度 100 min，柱温 45 ℃。

1.3.5 单糖组分分析

采用 Thermo ICS 5000 离子色谱系统，结合电化学检测器进行单糖组成测定（郭东东等，2021）。以岩藻糖，阿拉伯糖，鼠李糖，半乳糖，葡萄糖，木糖，甘露糖，果糖，核糖，半乳糖醛酸，古罗糖醛酸，葡萄糖醛酸，和甘露糖醛酸为标准品。称取多糖样品 5.0 mg 于色谱瓶中，加入 1 mL 2mol·L^{-1} 三氟乙酸（TFA）溶液于 121 ℃的条件下水解 2.0 h，通氮气，吹干后加入甲醇清洗吹干，重复甲醇清洗吹干过程 2～3 次至完全除去 TFA，加入适量无菌水溶解多糖，转入色谱瓶中待测。

色谱条件：Dionex™ CarboPac™ PA20 (150 mm × 3.0 mm, 10 um)阴离子色谱柱；进样量：5 uL；流动相 A: 0.1mol·L^{-1} NaOH，流动相 B: 0.1 mol·L^{-1} NaOH，0.2 mol·L^{-1} NaAc，流速 0.5 mL·min^{-1}；柱温：30 ℃。

1.3.6 抗氧化活性测定

（1） ·OH 清除能力测定

采用水杨酸法来测定多糖对·OH 清除能力，根据 Fenton 反应产生的·OH 与水杨酸反应，在 510 nm 处生成有色物质，当抗氧化剂存在时有色物质相应减少，因此，可通过吸光度的大小判断清除·OH 的能力。参考文献（葛智超等，2021）并稍加修改。称取多糖粉末，溶于适量纯水，配制不同质量浓度（0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.0) mg·mL^{-1} 的溶液，分别吸取 2 mL 于试管中，加入 9 mmol·L^{-1} 硫酸亚铁溶液和 8.8 mmol·L^{-1} 过氧化氢溶液(3%，*V/V*)各 1 mL，摇匀后加入 1 mL 9 mmol·L^{-1} 水杨酸-乙醇溶液，混合溶液于 37 ℃的条件下反应 1.0 h 后，在波长为 510 nm 处测定吸光度，以纯水和 Vc 溶液分别为空白对照和阳性对照，重复 3 次。

对·OH 的清除活性：

$$\text{清除率（\%）} = (1-\frac{A_2-A_3}{A_1})\times 100$$

A_1 为纯水代替样品的吸光度；A_2 加入样品溶液的吸光度；A_3 为不加过氧化氢溶液的吸光度。

（2）O_2^-·清除能力测定

采用邻苯三酚自氧化法测定多糖对 O_2^-·的清除能力，邻苯三酚在碱性的条件下迅速自氧化生成 O_2^-·，加入抗氧化剂会抑制自氧化速度，并由绿色变为黄色，因此，在 325 nm 下通过测吸光度的大小来判断抗氧化活性。参考文献（杨洋等，2018）并稍加修改。称取多糖粉末，溶于适量纯水，配制不同质量浓度(0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.0) mg·mL^{-1} 的溶液，分别吸取 2.0 mL 于试管中，加入 4.5 mL 50 mmol·L^{-1} Tris-HCl 缓冲液(pH 8.2)，在 25℃的条件下反应 20 min，加入 0.5 mL 25 mmol·L^{-1} 邻苯三酚溶液，反应 5 min 后加入 1mL 10 mmol·L^{-1} HCl 溶液终止反应，于 325 nm 处测定吸光度。以 Vc 作阳性对照，10 mmol·L^{-1} HCl 作空白对照，重复 3 次。

对 $O_2^{-}\cdot$的清除活性:

$$清除率（\%）=(1-\frac{A_2-A_3}{A_1})\times 100$$

A_1为纯水代替样品的吸光度；A_2加入样品溶液的吸光度；A_3为邻苯三酚溶液被纯水代替的吸光度。

（3）DPPH 清除能力测定

采用 DPPH 法对多糖的体外抗氧化活性进行测定，当抗氧化剂存在时，DPPH 溶液由深紫色变为淡黄色，在 517 nm 下吸光度变低，吸光度的变化与接受电子数量成定量关系，因而可对抗氧化能力进行分析。参考文献（王铖博等，2019）并稍加修改。称取多糖粉末，溶于适量纯水中，配置不同质量浓度(0.1、0.3、0.5、0.7、0.9、1.0) mg • mL^{-1}的溶液，分别吸取 2 mL 于试管中，加入 2 mL 2 mmol • L^{-1}的 DPPH-无水乙醇溶液，25 ℃避光反应 30 min，在 517 nm 处测定吸光度。以 Vc 溶液作阳性对照，纯水做空白对照，重复 3 次。

对 DPPH 的清除活性：

$$清除率（\%）=(1-\frac{A_1-A_2}{A_0})\times 100$$

A_0为纯水代替样品的吸光度；A_1加入样品溶液的吸光度；A_2为 DPPH-无水乙醇溶液被纯水代替的吸光度。

1. 4 数据处理

采用 Excel 2010 绘图及 SPSS 21.0 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 多糖的提取和含量测定

‘紫加 1 号’样品 300 g 经热水煮提过滤、醇沉、AB-8 大孔吸附树脂除杂脱色，浓缩干燥后得到粗多糖粉末 59.19 g，得率为 19.73%，多糖含量为（8.41±0.09）%。

2.2 DEAE-Cellulose 52 制备柱分离多糖

如图 1 所示，ASPS 在 DEAE-纤维素柱上的线性洗脱中主要分离出四个峰，分别对应超纯水、0.3 mol • L^{-1} NaCl、0.6 mol • L^{-1} NaCl 和 0.8 mol • L^{-1} NaCl 溶液。因此依次用 4 L 上述洗脱液分离 ASPS，洗脱液经减压浓缩、透析、冷冻干燥后得到 4 个组分，命名为 ASPA-1、ASPA-2、ASPA-3 和 ASPN，得率分别为 7.41%、4.87%、4.07%和 3.29%。

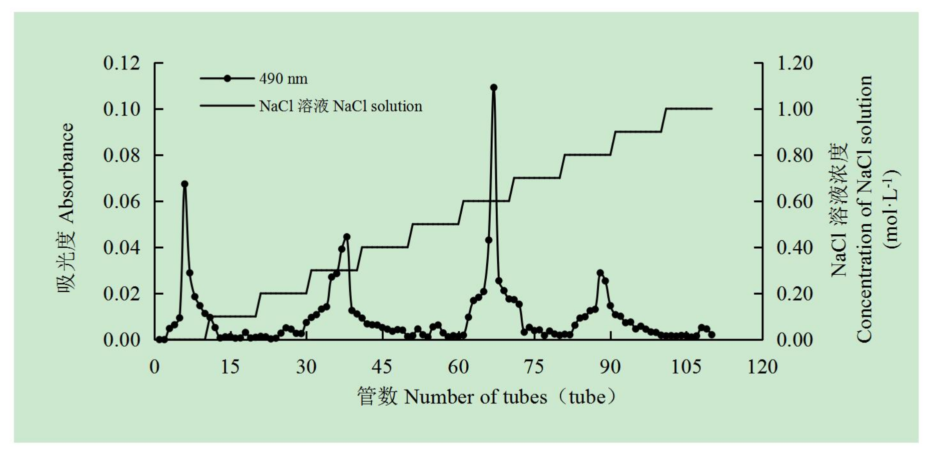


图 1 ASPS 的 DEAE-Cellulose 52 线性梯度洗脱曲线

Fig. 1 DEAE-Cellulose 52 gradient elution curve of ASPS

2.3 多糖的 Sephadex G-100 过滤层析结果

上述 4 个组分经 Sephadex G-100 凝胶柱纯化结果如图 2 所示，经凝胶柱纯化后的多糖为单一峰，证明其为分子量在一定范围内的均一组分，收集洗脱峰，得到不同级分的多糖，命名为 ASPA-1-1、ASPA-2-1、ASPA-3-1 和 ASPN-1，得率依次为 1.49%、2.13%、6.24%和 2.43%。

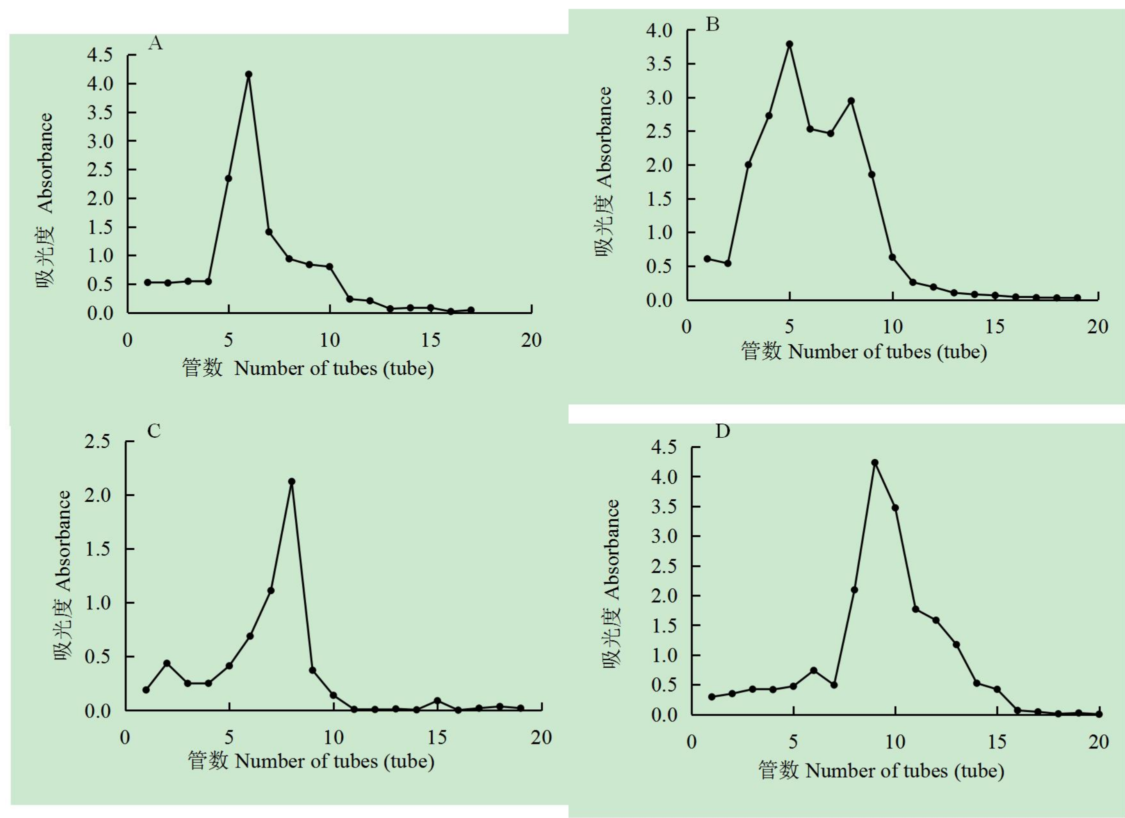


图 2 多糖的 Sephadex G-100 洗脱曲线

Fig. 2 Sephadex G-100 elution curve of polysaccharides

2.4 分子量测定

凝胶渗透色谱、多角度激光光散射检测器与示差折光检测器串联对多糖分子量的测定结果见表 1，ASPA-1-1、ASPA-2-1 和 ASPN-1 多分散系数接近 1.0 说明其相对分子质量分布成单分散性，即表明多糖相对分子质量分布范围较集中，纯度较高（Hu et al., 2017）。ASPA-3-1 多分散性指数最大，可能是因为其分子链长短分布不均匀从而导致分子量分布广（Liu et al., 2019）。均方根半径反映该分子松散程度，旋转半径越小说明样品的尺寸越小（江琦等，2019）但试验中各组分的旋转半径与重均分子质量的大小顺序不一致，这是可能是由于多糖样品在盐溶液中分子形状发生皱缩，从而导致分子大小降低（胡卫珍等，2020）。

表 1 不同多糖组分的分子量及分布

Table 1 Molecular weight and distribution of different polysaccharide components

多糖组分 Polysaccharide components	重均分子量 Weight average molecular weight (kDa)	多分散系数 Polydispersity （Mw • Mn^{-1}）	均方根半径 Radii of gyration (nm)
ASPA-1-1	8.10	1.254	19.0
ASPA-2-1	26.15	1.055	33.8
ASPA-3-1	0.91	3.474	23.2
ASPN-1	0.89	1.484	32.6

2.5 单糖组分分析

通过对比单糖标准品的保留时间推断单糖类型，如图 3，单糖标准品色谱图峰形匀称，说明各标准品色谱峰分离较好。采用内标法对单糖进行定量，发现单糖种类及比例存在明显差异，如图 4、表 2 所示，其中 ASPA-1-1 中半乳糖醛酸含量最高，ASPA-3-1 中葡萄糖醛酸含量最高，二者均未检测出核糖；ASPA-2-1 中核糖含量最高，半乳糖醛酸次之；ASPN-1 中葡萄糖含量最高，含有极少的糖醛酸，未检测出阿拉伯糖与核糖；4 个多糖中均未检测出古罗糖醛酸、甘露糖醛酸和果糖。

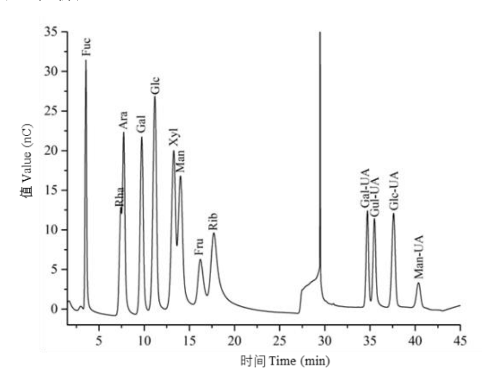


图 3 标准品的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of a standard substance

A. Fuc. 岩藻糖; **B.** Ara. 阿拉伯糖; **C.** Rha. 鼠李糖; **D.** Gal. 半乳糖; **E.** Glc. 葡萄糖; **F.** Xyl. 木糖; **G.** Man 甘露糖; **H.** Fru. 果糖; **I.** Rib. 核糖; **J.** Gal-UA. 半乳糖醛酸; **K.** Gul-UA. 古罗糖醛酸; **L.** Glc-UA. 葡萄糖醛酸; **M.** Man-UA. 甘露糖醛酸。下同。

A. Fuc. Fucose; **B.** Ara. Arabinose; **C.** Rha. Rhamnose; **D.** Gal. Galactose; **E.** Glc. Glucose; **F.** Xyl. Xylose; **G.** Man. Mannose; **H.** Fru. Fructose; **I.** Rib. Ribose; **J.** Gal-UA. Galacturonic acid; **K.** Gul-UA. Guluronic acid; **L.** Glc-UA. Glucuronic acid; **M.** Man-UA. Mannuronic acid. The same below.

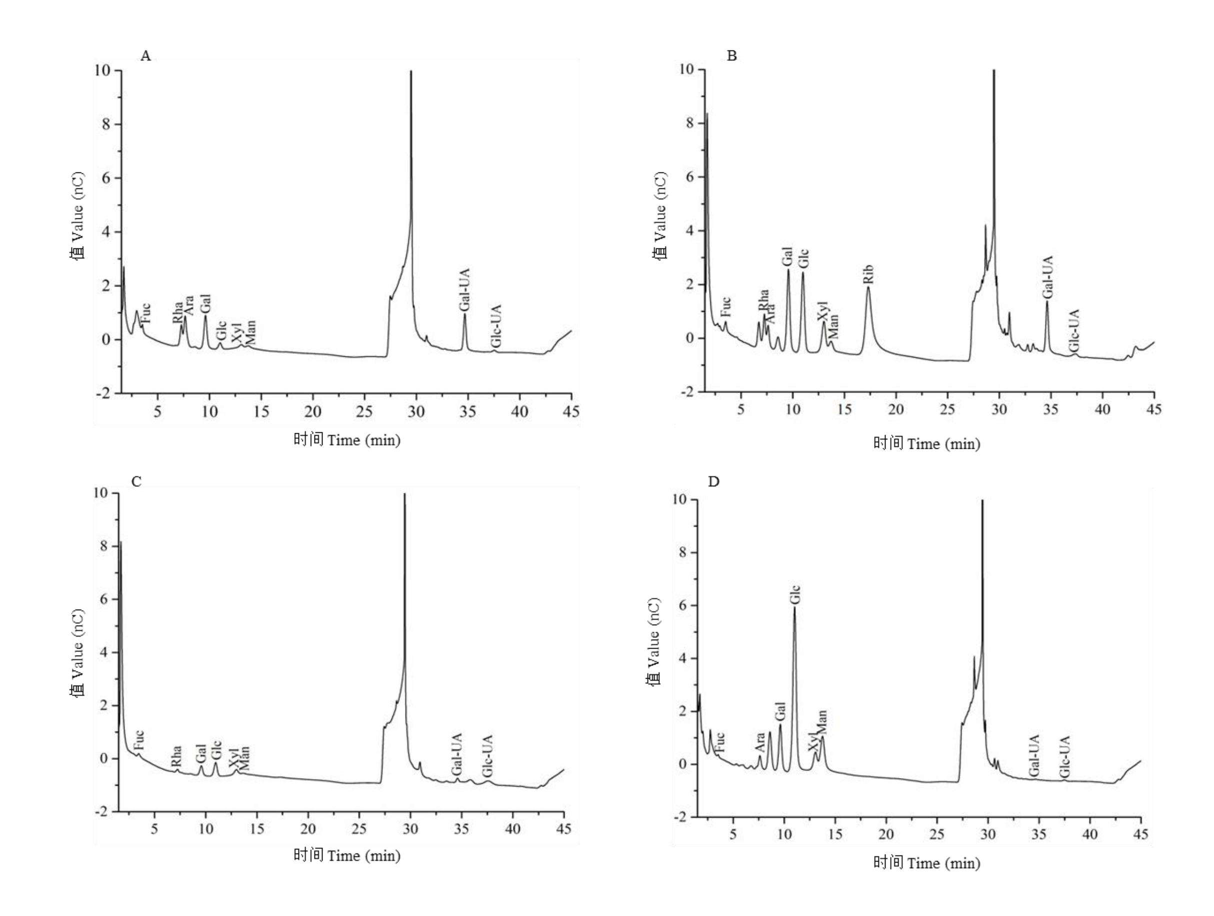


图 4 ‘紫加 1 号’多糖的单糖组成色谱图

Fig. 4 Chromatogram of monosaccharide composition of polysaccharides from ‘Zijia 1’

A. ASPA-1-1 的单糖组成色谱图；**B.** ASPA-2-1 的单糖组成色谱图；**C.** ASPA-3-1 的单糖成色谱; **D.** ASPN-1 的单糖组成色谱图

A. Chromatogram of monosaccharide composition of ASPA-1-1; **B.** Chromatogram of monosaccharide composition of ASPA-2-1; **C.** Chromatogram of monosaccharide composition of ASPA-3-1; **D.** Chromatogram of monosaccharide composition of ASPN-1.

表 2 不同多糖组分的单糖组成

Table 2 Monosaccharide composition of different polysaccharides

多糖组分 Polysaccharide component	各组分所占百分比 Percentage of each component (%)											
	Fuc	Ara	Rha	Gal	Glc	Xyl	Man	Fru	Rib	Gal-UA	Gul-UA	Glc-UA	Man-UA
ASPA-1-1	1.27	16.76	13.75	14.27	1.86	2.14	2.12	0.00	0.00	45.76	0.00	2.07	0.00
ASPA-2-1	1.31	9.07	2.81	11.37	8.37	4.57	2.31	0.00	36.01	22.47	0.00	1.70	0.00
ASPA-3-1	5.50	1.28	0.00	13.89	14.17	10.61	5.58	0.00	0.00	16.31	0.00	32.65	0.00
ASPN-1	0.45	0.00	5.06	16.69	46.92	7.22	21.85	0.00	0.00	0.60	0.00	1.21	0.00

2.6 抗氧化活性测定

2.6.1 ·OH 自由基清除能力

如图 5 所示，不同多糖组分对·OH 自由基的清除效果与多糖浓度呈量效关系，但清除率均低于阳性对照 Vc。当质量浓度为 1.0 mg · mL^{-1} 时，ASPA-1-1、ASPA-2-1、ASPA-3-1 和 ASPN-1 对·OH 的清除率分为 48.94%、96.07%、48.22%和 67.81%，对·OH 清除能力的 IC_{50} 值依次为 ASPA-2-1（0.17±0.008）mg · mL^{-1} ＞ASPN-1（0.36±0.033）mg · mL^{-1} ＞ASPA-1-1（1.35±0.336）mg · mL^{-1} ＞ASPA-3-1（2.01±0.050）mg · mL^{-1}，IC_{50} 值越小，自由基清除能力

越强。其中 ASPA-2-1 清除·OH 能力最强，这可能与多糖的糖醛酸含量和分子量有关，糖醛酸含量高且分子量大的多糖对·OH 清除能力更强，糖醛酸与反应溶液中的 Fe^{2+}螯合，从而减少了羟基的生成（Fan et al., 2019）。

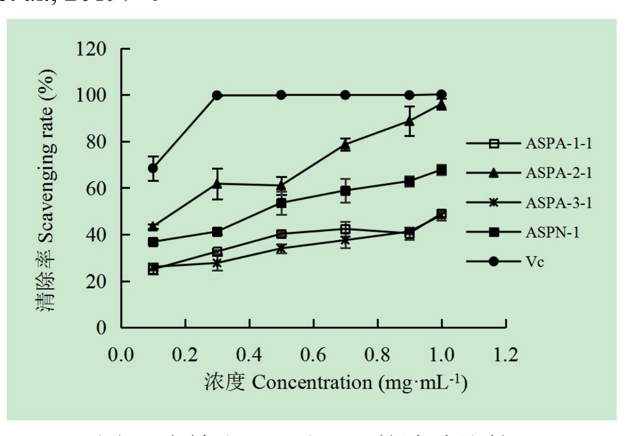


图 5 多糖和 Vc 对·OH 的清除比较

Fig. 5 Compare of scavenging ·OH between polysaccharides and Vc

2.6.2 O_2^-·自由基清除能力

如图 6 所示，随着浓度的增加，不同多糖组分对 O_2^-·的清除能力增强，表现出一定的浓度的依赖性，但清除率均低于阳性对照 Vc。当质量浓度为 1.0 mg · mL^{-1}时，ASPA-1-1、ASPA-2-1、ASPA-3-1 和 ASPN-1 对 O_2^-·的清除率分为 34.30%、46.84%、48.31%和 16.58%；对 O_2^-·清除能力的 IC_{50} 值依次为 ASPA-3-1（1.29±0.037）mg · mL^{-1}＞ASPA-2-1（1.49±0.045）mg · mL^{-1}＞ASPA-1-1（5.03±0.253）mg · mL^{-1}＞ASPN-1（7.56±0.160）mg · mL^{-1}，IC_{50} 值越小，自由基清除能力越强（龚雯等，2021）。ASPA-2-1 和 ASPA-3-1 清除 O_2^-·能力最强，且葡萄糖醛酸和半乳糖醛酸含量较高，这可能 ASPA-2-1 和 ASPA-3-1 属于酸性多糖，可能与其 O-H 键的解离能有关，越多的吸收电子基团如羧基、醛基连接于多糖上，O-H 键的解离能越弱，清除 O_2^-·的能力越强，终止自由基链反应，从而表现出明显的抗氧化活性（袁清霞等，2016）。

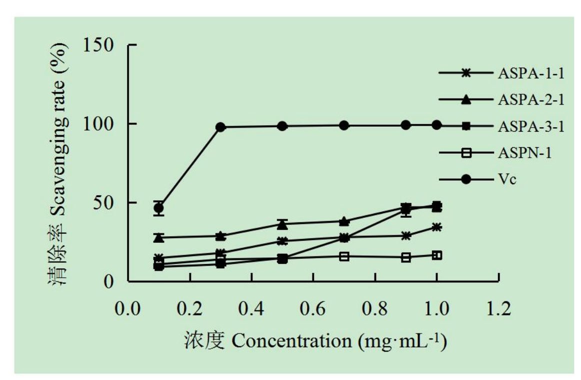


图 6 多糖和 Vc 对 O_2^-·的清除比较

Fig. 6 Compare of scavenging O_2^-· between polysaccharides and Vc

2.6.3 DPPH 自由基清除能力

如图 7 所示，不同多糖组分对 DPPH 的清除能力趋势一致，均随着浓度的增加而逐渐增加，但清除率始终低于阳性对照 Vc。当质量浓度为 1.0 mg · mL^{-1}时，ASPA-1-1、ASPA-2-1、ASPA-3-1 和 ASPN-1 对 DPPH 的清除率依次为 89.17%、89.02%、89.07%和 76.18%，对 DPPH 清除能力的 IC_{50} 值依次为 ASPA-2-1（0.01±0.003）mg · mL^{-1}＞ASPA-1-1（0.14±0.002）mg · mL^{-1}＞ASPA-3-1（0.15±0.017）mg · mL^{-1}＞ASPN-1（0.50±0.002）mg · mL^{-1}，其分子量大小与清除自由基能力呈正相关，ASPA-2-1 对 DPPH 的清除能力最强，原因可能是糖醛酸可以活化

异头碳上的氢原子，与自由基结合形成稳定的 DPPH-H 结构，从而终止自由基反应（李学秀等，2022；魏晨业等，2021）。

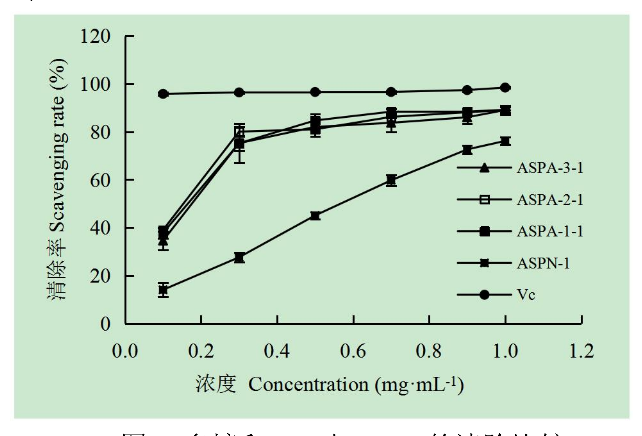


图 7 多糖和 Vc 对 DPPH 的清除比较

Fig. 7 Compare of scavenging DPPH between polysaccharides and Vc

3 讨论与结论

本研究通过水提醇沉得到刺五加新品种‘紫加 1 号’多糖（ASPS），ASPS 经 DEAE-Cellulose 52 联合 Sephadex G-100 柱层析分离纯化，得到 4 个多糖组分 ASPA-1-1、ASPA-2-1、ASPA-3-1 和 ASPN-1，中性多糖 ASPN-1 中葡萄糖所占比例最高，含有极少的糖醛酸；酸性多糖 ASPA-1-1、ASPA-2-1 和 ASPA-3-1 中半乳糖醛酸和葡萄糖醛酸所占比例较高，与白也明等（2015）从刺五加根茎分离出的半乳糖醛酸含量较高相似，不同的是‘紫加 1 号’中葡萄糖醛酸含量较高，而在刺五加中含量低于 1.10%。ASPA-1-1 和 ASPA-3-1 分子量分别为 8.10 kDa 和 0.91 kDa，小于白也明等（2015）从刺五加中分离的酸性多糖分子量 10.0 kDa ~ 48.0 kDa，可能是因为品种、产地、提取方法和测定方法的不同而不同。

采用清除·OH、O_2^-·和 DPPH 三种自由基的方法是评价活性物质体外抗氧化能力的常见方法；本研究得到的 4 个多糖组分对·OH、O_2^-·和 DPPH 均有明显的清除作用，且抗氧化能力与糖浓度呈现量效关系，即随着多糖浓度的增加抗氧化能力也逐渐增强。其中 ASPA-2-1 分子量最大为 26.15 kD、半乳糖醛酸含量较高 22.47%，并且清除·OH 和 DPPH 自由基的能力最强，IC_{50} 值分别为（0.17±0.008）mg · mL^{-1} 和（0.01 ±0.003）mg · mL^{-1}，与沈宇等（2020）发现刺五加果多糖在分子量 10 ~ 50 kDa 时抗氧化能力最高和胡彦波等（2022）发现薇菜中半乳糖醛酸含量较高的 WOJP-A 清除·OH 的能力强于 WOJP-N 相似，原因可能是糖醛酸含量高且分子量大的多糖能够与阻断自由基得电子，从而终止一系列自由基链反应，由此可知，多糖的抗氧化活性与其分子量、糖醛酸含量和单糖组成等因素相关 XIE 等（2016）。据文献报道，糖醛酸含量较高的多糖具有较强的抗氧化能力（Yan et al., 2019），ASPA-3-1 清除 O_2^-·能力最强，IC_{50} 值为（1.29±0.037）mg · mL^{-1}，其富含葡萄糖醛酸 16.31%和半乳糖醛酸 32.70%，原因可能是糖醛酸可以激活异头碳上的氢原子供氢清除自由基，使其转化为稳定的化合物而阻断氧化连锁反应，进而赋予多糖较强的抗氧化活性（Monirsadat et al., 2020; Hepef et al., 2016）。

本研究通过分离纯化联合多种色谱手段对‘紫加 1 号’多糖的单糖组成和分子量进行测定，在前人研究基础上推进了对‘紫加 1 号’多糖的认知，为深入探索其化学成分与抗氧化机制奠定基础，同时也为进一步开发利用该植物提供科学依据。但目前关于‘紫加 1 号’多糖不同级分的构成单元及连接方式仍未明确，后续研究应采用先进的技术明确多糖的精细结构，及通过动物试验进一步证实体内抗氧化作用及分子机制。

参考文献：

BAI YM, 2015. Isolation, purification and structure analysis of polysaccharides from *Acanthopanax senticosus* [D]. Changchun: Northeast Normal University. [白也明, 2015. 刺五加多糖的分离纯化和结构研究[D].长春：东北师范大学.]

FAN J, FENG H, YU Y, et al., 2017. Antioxidant activities of the polysaccharides of *Chuanminshen violaceum* [J]. Carbohyd Polym, 10(157): 629-636.

GUAN Y, GUO YD, CHEN G, et al., 2018. Analysis and quality evaluation of nutritional components in the Purple *Acanthopanax senticosus* [J]. J Food Saf Qual, 9(5): 1021-1025. [管颖, 郭艳东, 陈果, 等, 2018. 紫加 1 号的营养成分分析与评价[J]. 食品安全质量检测学报, 9(5): 1021-1025.]

GUO DD, LEI JY, PENG ZJ, et al., 2021. Extraction optimization, structural characterization and physicochemical properties of polysaccharides from *Clitocybe squam ulosa* fruiting body[J]. Acta Edulis Fungi, 28(4): 39-47. [郭东东, 雷佳钰, 彭志杰, 等, 2021. 鳞杯伞子实体多糖提取工艺优化及其结构与理化性质[J].食用菌学报, 28(4): 39-47.]

GE ZC, LANG M, LI Y, 2021. Isolation， purification, monosaccharide composition and antioxidant activity analysis of *Euglena gracilis* polysaccharides [J]. J Shanghai Ocean Univ, 30(3): 564-571. [葛智超, 郎蒙, 李燕, 2021. 裸藻多糖的分离纯化、单糖组成及其抗氧化活性[J]. 上海海洋大学学报, 30(3): 564-571.]

GONG W, TANG J, WEI YY, et al., 2021. Isolation， purification, structural characterization of polysaccharide from *Camellia Nitidissima* Chi and its antioxidant activities in vitro [J]. Packag. Food Mach, 37(6): 184-190. [龚雯, 唐婕, 韦雅渊, 等, 2021. 金花茶多糖分离纯化、结构表征及其体外抗氧化性[J]. 食品与机械, 37(6): 184-190.]

HE PF, ZHANG AQ, ZHANG FM, et al., 2016. Structure and bioactivity of a polysaccharide containing uronic acid from *Polyporus umbellatus* sclerotia[J]. Carbohyd Polym, 152: 222-230.

HU WZ, QI ZY, CHEN XF, et al., 2020. Determination of molecular weight and distributi on of *Dendrobium officinale* polysaccharide by gel permeation chromatography couple d with multi angle laser light scattering [J]. Zhejiang Agricultural Sciences, 61(6): 11 66-1167. [胡卫珍, 齐振宇, 陈晓芳, 等, 2020. 凝胶渗透色谱联用多角度激光光散射测定铁皮石斛多糖分子量及其分布[J]. 浙江农业科学, 61(6): 1166-1167.]

HU T, HUANG QL, WONG KH, et al., 2017. Structure, molecular conformation, and immunomodulatory activity of four polysaccharide fractions from *Lignosus rhinocerotis* sclerotia [J]. Int J Biol Macromol, 94 (Pt A): 423-430.

JI PY, WANG HJ, 2022. Effect of *Acanthopanax senticosus* polysaccharide on growth performance, immune function and antioxidant capacity of broilers [J]. Feed Res, 45(4): 52-55. [姬普雨, 王慧景. 2022. 刺五加多糖对肉鸡生长性能、免疫功能和抗氧化能力的影响[J]. 饲料研究, 45(4): 52-55.]

JIANG Q, LOU ZX, WANG ZQ, et al., 2019. Isolation and purification, structure and molecular conformation and antioxidant activities of polysaccharides from *Cordyceps militaris* [J]. Food Ferment Ind, 45(1): 22-28. [江琦, 娄在祥, 王正齐, 等, 2019. 蛹虫草多糖的分离纯化、分子构象分析及抗氧化活性研究[J]. 食品与发酵工业, 45(1): 22-28.]

LIU Y, ZHENG DD, WANG DH, et al., 2019. Immunomodulatory activities of polysaccharides from white button mushroom, *Agaricus bisporus* (Agaricomycetes), fruiting bodies and

cultured mycelia in healthy and immunosuppressed mice[J]. Int J Med Mushrooms, 21(1): 13-27.

LI XX, LIU HT, AN YZ, et al., 2022. Study on separation, purification and antioxidant activities of hemicelulose polysaccharides from Eucalyptus pre-hydrolysate [J]. China Pulp & Paper, 41(4): 30-37. [李学秀，刘海棠，安永贞，等, 2022. 桉木预水解液中半纤维素多糖分离纯化及抗氧化活性研究[J]. 中国造纸, 41(4): 30-37.]

MONIRSADAT M, MOHAMMAD RA, LEILA K, 2020. Antioxidant, antiradical, and antimicrobial activities of polysaccharides obtained by microwave-assisted extraction method: a review[J]. Carbohyd Polym, 229: 115421.

PAN Y, XU J W, 2016. Isolation, purification and antioxidant activity of polysaccharides from *Zizyphus jujube* cv. Dongzao [J]. Food Sci, 37(13): 89-94. [潘莹，许经伟, 2016. 冬枣多糖的分离纯化及抗氧化活性研究[J]. 食品科学, 37(13): 89-94.]

PENG L, ZHOU YH, WANG D, 2020. Research progress in anti-tumor effect and mechanism of *Acanthopanax senticosus* polysaccharides [J]. J Hubei Univ Sci Technol (Med Edi), 34(6): 546-549. [彭莉，周燕红，王丹, 2020. 刺五加多糖抗肿瘤作用及其机制研究进展[J]. 湖北科技学院学报（医学版）, 34 (6): 546-549.]

SHEN Y, ZHAO HB, ZHAO H, et al., 2020. Study on separation of Acanthopanax polysaccharide and its antioxidant activity by ultrafiltration [J]. Heilongjiang Med Pharm, 43 (5): 8-11. [沈宇，赵宏博，赵宏，等, 2020. 超滤法分离刺五加果多糖及其抗氧化活性的研究[J]. 黑龙医药科学,43(5): 8-11.]

TAN CJ, WANG B, ZOU WQ, et al., 2022. Extraction technology and antioxidant activity of polysaccharide from traditional Chinese medicine compositions[J]. J Beihua Univ, Nat Sci, 23 (2): 218 - 224. [谭超杰，王博，邹文奇，等, 2022. 中药组合物多糖的提取工艺及抗氧化活性研究[J].北华大学学报(自然科学版), 23(2): 218-224.]

ULLAH S; KHALIL A A; SHAUKAT F. et al., 2019. Sources extraction and biomedical properties of polysaccharides [J]. Foods, 8 (8): 304.

WANG ZQ, 2018. Artificial domestication and cultivation techniques of plateau characteristic healthy vegetable purple *Acanthopanax senticosus* [J]. Yunnan Agric, 2018(8): 66-67. [王正琴, 2018. 高原特色养生蔬菜紫五加人工驯化栽培技术[J]. 云南农业, 2018(8): 66-67.]

WANG CB, CHEN LL, JIAO CZ, et al., 2019. Structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide in *Sorbus koehneana* fruit[J]. Kuang-hsi Chih Wu, 39 (11): 1527-1533. [王铖博，陈乐乐，焦彩珍，等, 2019. 陕甘花楸果实多糖的结构表征及抗氧化活性研究[J]. 广西植物, 39(11): 1527-1533.]

WEI CY, BAO XW, WANG J, et al., 2021. Isolation, purification and antioxidant activity of polysaccharides from the fruit of *Hippophae rhamnoides* [J]. Food Sci, 42(4): 227-232. [魏晨业，包晓玮，王娟，等, 2021. 沙棘多糖分离纯化及抗氧化活性[J]. 食品科学, 42(4): 227-232.]

XIE XF, ZOU GL, LI CH, 2016. Purification, characterization and in vitro antioxidant activities of polysaccharide from *Chaenomeles speciosa* [J]. Int J Biol Macromol, 92: 702-707.

YAN JM, ZHU L, QU YH, et al., 2019. Analyses of active antioxidant polysaccharides from four edible mushrooms [J]. Int J Biol Macromol, 123: 945-956.

YANG XF, ZENG YP, LU N, et al., 2019. Optimization of pigment extraction from purple *Acanthopanax senticosus* by response surface methodology and its stability [J]. J Mol Sci, 35(5): 432-440. [杨先峰，曾艳萍，吕娜，等, 2019. 响应面法优化紫五加色素提取工艺

及其稳定性研究[J]. 分子科学学报, 35(5): 432-440.]

YUM, WANG B, FU YS, et al., 2019. Reaserch on extraction technology of polysaccharides from *Acanthopanax senticosus* waste residue by response surface methodology [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 50(7): 1610-1613. [于淼, 王冰, 付叶珊, 等, 2019. 响应面法优化刺五加根废弃物多糖提取工艺的研究[J]. 中草药, 50(7): 1610-1613.]

YANG Y, WANG YF, MA YX, et al., 2018. Preparation and structural characteristics of sulfated polysaccharides from *Aralia chinensis* root-bark and its antioxidant activity [J]. Kuang-hsi Chih Wu, 38(7): 911-923. [杨洋, 王一峰, 马诣欣, 等, 2018. 楤木根皮多糖硫酸酯的制备、结构表征及抗氧化活性的研究[J]. 广西植物, 38(7): 911-923.]

YUAN QX, 2016. Isolation, purification, structure and bioactivity of polysaccharides from mulberry (*Morus Alba* L.) leaves [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University. [袁清霞, 2016. 桑叶多糖分离纯化、结构分析及生物活性研究[D]. 南京: 南京农业大学.]

ZHOU Y, YANG DP, QIAN CG, et al., 2021. Purification, structural characterization and antioxidant activity of polysaccharide from the rhizome of *Amomum villosum Lour*[J]. Food Ferment Ind, 47(16): 52-58. [周洋, 杨得坡, 钱纯果,等, 2021. 阳春砂根茎多糖分离纯化、结构表征及抗氧化活性[J]. 食品与发酵工业, 47(16): 52-58.]